

R-1070 (訂正版)

## 最終報告書

(訂正版)

試験表題：4-クロロベンズアルデヒドのラットを用いた  
経口投与による簡易生殖毒性試験

試験番号：R-1070

作成日：2012年4月27日

試験期間：2010年9月28日~2011年3月30日

試験実施施設

株式会社ボゾリサーチセンター 御殿場研究所  
〒412-0039 静岡県御殿場市かまど 1284

試験委託者

厚生労働省医薬食品局審査管理課化学物質安全対策室  
〒100-8916 東京都千代田区霞が関 1-2-2

株式会社ボゾリサーチセンター  
〒151-0065 東京都渋谷区大山町 36-7

1. 目次

|       |                                |    |
|-------|--------------------------------|----|
| 1.    | 目次 .....                       | 2  |
| 3.    | 要約 .....                       | 8  |
| 3.1   | 雌雄動物に対する影響 .....               | 8  |
| 3.2   | 生殖発生に対する影響 .....               | 8  |
| 4.    | 緒言 .....                       | 9  |
| 5.    | 試験材料及び方法 .....                 | 10 |
| 5.1   | 被験物質及び媒体 .....                 | 10 |
| 5.1.1 | 被験物質 .....                     | 10 |
| 5.1.2 | 媒体 .....                       | 11 |
| 5.2   | 投与液の調製及び保存方法 .....             | 11 |
| 5.2.1 | 投与液の調製及び保存 .....               | 11 |
| 5.2.2 | 投与液の安定性 .....                  | 11 |
| 5.2.3 | 投与液の濃度・均一性確認 .....             | 11 |
| 5.3   | 試験動物種及び系統の選択理由 .....           | 12 |
| 5.4   | 試験動物 .....                     | 12 |
| 5.5   | 群分け .....                      | 13 |
| 5.6   | 飼育条件 .....                     | 13 |
| 5.7   | 動物の識別 .....                    | 13 |
| 5.8   | 投与経路、投与期間及び投与回数とそれらの選択理由 ..... | 14 |
| 5.9   | 投与方法 .....                     | 14 |

|        |  |    |
|--------|--|----|
| 5.10   | 投与量及び群構成 .....                                       | 14 |
| 5.11   | 投与量の設定根拠 .....                                       | 14 |
| 5.12   | 観察及び検査の方法 .....                                      | 15 |
| 5.12.1 | 一般状態の観察 .....  | 15 |
| 5.12.2 | 体重測定 .....   | 15 |
| 5.12.3 | 摂餌量測定 .....  | 15 |
| 5.12.4 | 膣垢検査 .....   | 15 |
| 5.12.5 | 交配方法 .....   | 15 |
| 5.12.6 | 分娩及び哺育観察 .....                                       | 16 |
| 5.12.7 | 出生児の観察及び測定 .....                                     | 16 |
| 5.12.8 | 病理学検査 .....  | 16 |
| 5.13   | 統計解析 .....   | 17 |
| 5.13.1 | パラメータの算出 .....                                       | 17 |
| 5.13.2 | 検定 .....   | 17 |
| 6.     | 試験結果 .....   | 19 |
| 6.1    | 一般状態 (Table 1-1~1-5、Appendix 1-1~1-17) .....         | 19 |
| 6.2    | 体重 (Fig. 1、2、Table 2-1~2-4、Appendix 2-1~2-14) .....  | 19 |
| 6.3    | 摂餌量 (Fig. 3、4、Table 3-1~3-4、Appendix 3-1~3-14) ..... | 19 |
| 6.4    | 器官重量 (Table 4、Appendix 4-1~4-3) .....                | 19 |
| 6.5    | 剖検所見 (Table 5-1~5-4、Appendix 5-1~5-96) .....         | 19 |
| 6.6    | 病理組織学検査 (Table 6-1~6-4、Appendix 5-1~5-96) .....      | 20 |
| 6.7    | 性周期 (Table 7、Appendix 6-1~6-4) .....                 | 20 |
| 6.8    | 交配成績 (Table 8、Appendix 7-1~7-3) .....                | 20 |
| 6.9    | 分娩成績 (Table 9、Appendix 8-1~8-3) .....                | 20 |
| 6.10   | 出生児の性比及び外表観察 (Table 10、Appendix 9-1~9-3) .....       | 20 |
| 6.11   | 出生児の生存率 (Table 11、Appendix 10-1~10-3) .....          | 20 |
| 6.12   | 出生児の体重 (Table 12、Appendix 11-1~11-3) .....           | 21 |
| 6.13   | 出生児の生後4日剖検所見 (Table 13、Appendix 12-1~12-3) .....     | 21 |
| 7.     | 考察 .....   | 22 |
| 7.1    | 雌雄動物に対する影響 .....                                     | 22 |
| 7.2    | 生殖発生に対する影響 .....                                     | 22 |
| 8.     | 文献 .....   | 24 |

図

|          |     |
|----------|-----|
| Fig. 1、2 | 体重  |
| Fig. 3、4 | 摂餌量 |

表

|               |              |
|---------------|--------------|
| Table 1-1~1-5 | 一般状態         |
| Table 2-1~2-4 | 体重           |
| Table 3-1~3-4 | 摂餌量          |
| Table 4       | 器官重量         |
| Table 5-1~5-4 | 剖検所見         |
| Table 6-1~6-4 | 病理組織学検査      |
| Table 7       | 性周期          |
| Table 8       | 交配成績         |
| Table 9       | 分娩成績         |
| Table 10      | 出生児の性比及び外表観察 |
| Table 11      | 出生児の生存率      |
| Table 12      | 出生児の体重       |
| Table 13      | 出生児の生後4日剖検所見 |

### 3. 要約

4-クロロベンズアルデヒドを 0 (対照群：トウモロコシ油)、40、200 及び 1000 mg/kg/day の投与量で、Sprague-Dawley 系 SPF ラット (1 群雌雄各 12 匹) の、雄に交配前 14 日間及び交配期間を通して剖検前日まで 42 日間、雌には交配前 14 日間及び交配期間並びに妊娠期間を通して授乳 4 日まで (42~45 日間) 経口投与し、雌雄動物に対する影響、特に生殖発生毒性について概略的に検討した。なお、1000 mg/kg 投与群では、雌雄とも交配前投与期間中に死亡が多発し、生殖発生に関する評価に耐えないと判断されたため、投与 14 日に投与を中断して生存雌雄全例について病理検査を実施した。

#### 3.1 雌雄動物に対する影響

1000 mg/kg 投与群の雌雄において振戦及び自発運動の低下などの一般状態変化がみられ、投与 9 日までに雄 9 例、雌 7 例が死亡した。同群の体重は雌雄ともに投与初期に減少を示し、摂餌量が低値を示した。また、投与 14 日まで観察し得た雌 5 例中 4 例に性周期の異常 (連続休止期) が認められた。病理組織学検査では、死亡例において雄では精巣上体頭部の精巣上体管に上皮細胞の単細胞壊死、前立腺腹葉に上皮細胞の単細胞壊死、精嚢に上皮細胞の単細胞壊死、脾臓の萎縮、腺胃のびらん及び前胃粘膜の変性、雌では膈上皮細胞の粘液細胞化、脾臓の萎縮及び腺胃のびらんがみられた。投与を中断した雌において膈に上皮細胞の粘液細胞化がみられた他、子宮に脱落膜腫がみられた。200 mg/kg 以下の投与群では死亡はみられず、一般状態、体重、摂餌量及び病理学検査に被験物質投与に起因した変化あるいは異常は認められなかった。

#### 3.2 生殖発生に対する影響

1000 mg/kg 投与群を除いて性周期、交尾までに要した日数、交尾率、授精率及び受胎率に被験物質投与の影響を示唆する変化は認められなかった。更に、出産率、妊娠期間、黄体数、着床痕数、着床率、死産児率、出生児数及び出生率に被験物質投与の影響は認められず、分娩及び哺育において被験物質投与に起因した異常は認められなかった。

出生児の体重、性比及び生後 4 日生存率に被験物質投与の影響は認められず、外表観察及び剖検において被験物質投与起因した異常は認められなかった。

これらの結果から、本試験条件下における 4-クロロベンズアルデヒドの雌雄動物に対する無影響量及び無毒性量はともに 200 mg/kg/day と推察され、一方、交尾から受胎に至る雌雄動物の生殖機能並びに母体機能としての妊娠の維持、分娩及び哺育並びに出生児に対して本被験物質の 200 mg/kg/day 投与は影響を及ぼさないと考えられた。

R-1070 (訂正版)

#### 4. 緒言

厚生労働省医薬食品局審査管理課化学物質安全対策室の委託により、4-クロロベンズアルデヒドのラットを用いた経口投与による簡易生殖毒性試験を実施したので、その成績を報告する。

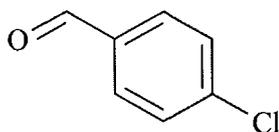
## 5. 試験材料及び方法

## 5.1 被験物質及び媒体

## 5.1.1 被験物質

4-クロロベンズアルデヒドは から以下の情報とともに購入した。  
また、試験開始前に赤外吸収スペクトルの測定により特性が確認されている<sup>1)</sup>。

|          |   |                                     |
|----------|---|-------------------------------------|
| 名称       | : | 4-クロロベンズアルデヒド<br>(別名：p-クロロベンズアルデヒド) |
| 英語名称     | : | 4-Chlorobenzaldehyde                |
| CAS 番号   | : | 104-88-1                            |
| 官報公示整理番号 | : | 3-1162                              |
| 構造式又は示性式 | : |                                     |



|          |   |  |
|----------|---|--|
| 分子式      | : | C <sub>7</sub> H <sub>5</sub> ClO  |
| 分子量      | : | 140.57   |
| 常温における性状 | : | 白色~うすい黄色の固体 (結晶~粉末)  |
| 純度 (GC)  | : | 99.8%  |
| 融点       | : | 48.7°C   |
| 入手量      | : | 975 g (500g ; 2本)  |
| 保存方法     | : | 密栓、冷暗所〔冷暗所として冷蔵庫内 (許容温度：1~10°C、実測温度：2~8°C) に保存した。〕   |
| 保存場所     | : | 御殿場研究所被験物質保存室、生化学部標準物質保存場所及び第2研究棟4階被験物質調製室   |
| 取扱い上の注意  | : | 作業場の換気を十分に行い、マスク、保護眼鏡、保護手袋等の適切な保護具を着用し、直接の接触を防ぐ。取り扱い後は、手、顔等を良く洗い、うがいをする。                           |
| 安定性      | : | 投与期間終了後、残余被験物質の赤外吸収スペクトルを確認した結果、実験実施前に確認した参照スペクトル <sup>1)</sup> とほぼ同様であり、投与期間を通して被験物質は安定であったと判断した。 |
| 残量の処理    | : | 被験物質 5 g を保存試料として御殿場研究所被験物質保存室に保存した。動物試験及び分析終了後の残量は全て焼却処分した。                                       |

### 5.1.2 媒体

|       |   |                      |
|-------|---|----------------------|
| 名称    | : | トウモロコシ油              |
| 製造者   | : | ナカライテスク株式会社          |
| ロット番号 | : | V0M3906              |
| 保存方法  | : | 室温                   |
| 保存場所  | : | 御殿場研究所第2研究棟4階被験物質調製室 |

なお、媒体については、先に実施された「p-クロロベンズアルデヒドのラットにおける28日間反復経口投与毒性試験」<sup>2)</sup>において投与液の媒体として用いられたトウモロコシ油を選択するとともに陰性対照物質として対照群の投与に使用した。

## 5.2 投与液の調製及び保存方法

### 5.2.1 投与液の調製及び保存

濃度ごとに必要量の被験物質を正確に秤取し、乳鉢に移して微細化した後、徐々に少量の媒体を加えて懸濁させ、本懸濁液をメスシリンダーに移し、更に媒体を加え規定濃度(4、20及び100 mg/mL)となるよう調製した。対照群の投与に用いる媒体を含め、投与液は1日使用分ごと褐色ガラス瓶に小分けし、室温下(許容温度:1~30°C、実測温度:19~23°C)に保存し、調製日を含め7日以内の投与に使用した。

### 5.2.2 投与液の安定性

本被験物質はトウモロコシ油を媒体とする0.8及び100 mg/mL液中において、室温保存で14日間安定であることが株式会社 化合物安全性研究所で確認されている<sup>2)</sup>。

### 5.2.3 投与液の濃度・均一性確認

雄の投与1週と投与6週の2回、投与に用いる各濃度の投与液について、投与に使用する前にHPLC法により濃度及び均一性を確認した。その結果、規定濃度に対する各投与液の測定濃度の割合は93.5~102.0%、変動係数(CV)は0.8~3.2%であり、いずれも許容範囲内(濃度:表示値に対する割合:100.0±10.0%、均一性:CV10%以内)であった。なお、濃度測定は当試験施設において確立された分析法<sup>1)</sup>に従い、用いた標準物質、HPLCシステム及び測定条件は以下の如くであった。分析法の概略を以下に示す。

#### [標準物質]

被験物質の一部を標準物質として使用した。

## [HPLC システム]

| 機器名及び型式 |                       | メーカー               |
|---------|-----------------------|--------------------|
| HPLC    | 2695 セパレーションモジュール     | Waters Corporation |
| 検出器     | 2487 デュアルλ UV/VIS 検出器 |                    |
| データ処理装置 | Empower               |                    |

## [HPLC 測定条件]

|               |   |   |
|---------------|---|---|
| カラム           | : | L-Column ODS (4.6 mm I.D. × 150 mm、粒子径 5 μm、<br>一般財団法人化学物質評価研究機構) |
| カラム恒温槽設定温度    | : | 40°C  |
| HPLC 移動相      | : | アセトニトリル/精製水/THF 混液<br>(400/400/200、v/v/v)                         |
| 流量            | : | 1 mL/min  |
| 検出            | : | UV (測定波長 254 nm)  |
| 注入量           | : | 5 μL  |
| オートサンプラー内設定温度 | : | 10°C  |

## 5.3 試験動物種及び系統の選択理由

毒性試験法ガイドラインによりげっ歯類を用いた試験が必要とされており、また、一般毒性試験、生殖発生毒性試験に広く用いられ、背景資料が豊富である系統を選択した。

## 5.4 試験動物

Sprague-Dawley 系 SPF ラット [CrI:CD(SD)、日本チャールス・リバー株式会社、筑波飼育センター] の雌雄各 62 匹をそれぞれ 8 週齢で入手<sup>注)</sup>し、入荷日を馴化 1 日と起算して、3 日間の検疫期間を含めて 19 日間馴化飼育した。その間、一般状態を毎日 1 回観察し、体重を馴化 1、3、8、13 及び 19 日に測定した。雌については、更に膣垢を馴化 4~17 日の間採取し、多数の角化上皮細胞から成る膣垢像を発情の指標とし、4~5 日の周期で回帰するものを正常として性周期異常の有無を調べた。その結果、いずれの動物も一般状態及び性周期に異常は認められず、順調な体重推移がみられた。試験へは、これらの動物より雌雄各 48 匹を選択して 10 週齢で使用した。

注) : 試験計画書に従い、動物発注数は雌雄各 60 匹であったが、実際には各 62 匹が納入された。  
なお、試験計画書では厚木飼育センターより入手としていたが、筑波飼育センターよりの入手となった。本件に関し、試験計画書変更書は作成されなかったが、入手した動物の系統には相違がなく、試験遂行上問題はなかった。

## 5.5 群分け

前項に記載された馴化中の観察、検査結果に基づいて選抜された雌雄各 48 匹は、群分け当日の体重を基に各群の平均体重ができるだけ均等となるよう各群に割付けた。個体の割付けはコンピュータを用いたブロック配置法及び無作為抽出法の組み合わせ（ブロック配置法で必要な群を構成し、試験群及び群内の個体番号を無作為に割当てた）で行った。群分けは投与開始前日に行った。投与開始時の体重は、雄で 389~449 g（平均体重：416 g）、雌は 234~271 g（平均体重：250 g）であり、雌雄とも平均値±20%以内の体重範囲であった。群分けから除外された雄 14 匹は投与開始当日に試験から除外した。残りの雌 14 匹は交配用無処置動物として継続飼育したが、交配に用いなかったため、交配終了後、試験から除外した。

## 5.6 飼育条件

飼育は、温度  $23\pm 3^{\circ}\text{C}$ （実測値： $20\sim 25^{\circ}\text{C}$ ）、相対湿度  $50\pm 20\%$ （実測値：41~69%）、換気回数 10~15 回/h、照明 12 時間/日（07:00~19:00）の動物飼育室（飼育室番号：901 号室）で行った。動物は、交配中を除いてブラケット式金属製網ケージ（W254×D350×H170 mm：リードエンジニアリング株式会社）へ個別に収容した。なお、妊娠 17 日から授乳 4 日までは、床敷（ホワイトフレック：日本チャールス・リバー株式会社）を入れたプラスチック製エコンケージ（W340×D400×H185 mm：日本クレア株式会社）へ 1 腹ごと収容した。飼料及び飲料水については、NMF 固形飼料（放射線滅菌、オリエンタル酵母工業株式会社、ロット番号:100713、100817）及び水道水（御殿場市営水道水）をステンレス製給餌器あるいは自動給水装置又は給水瓶を用いてそれぞれ自由に摂取させた。飼料に関しては供試全ロットについて、床敷については、定期的（年 6 回）にそれぞれ Eurofins Scientific Analytice で実施された混入物質の分析結果を入手した。飲料水については、芝浦セムテック株式会社（旧社名：東芝機械環境センター株式会社）に定期的（年 4 回）に水質検査を依頼し、その結果を入手した。これらの検査結果より飼料、飲料水及び床敷中の混入物質が試験成績に影響を与える可能性のないことを確認した。

## 5.7 動物の識別

動物の個体識別は入荷時に 3 桁の番号が連番で刻印された小動物用耳標をつけて行った。群分け後は、性別及び投与量ごと（対照群、低、中及び高用量の順）に 4 桁の番号をつけた。なお、1000 の位は群、100 の位は性（0 番を雄、1 番を雌）、10 と 1 の位は個体番号とした。飼育ケージには、投与量（群）ごとに色分けされ、試験番号、投与経路、投与量、性、動物番号、耳標番号、剖検予定日（雄）、交尾成立日（雌雄）及び分娩日（雌）を明記したラベルを付した。

### 5.8 投与経路、投与期間及び投与回数とそれらの選択理由

投与経路は、OECD Guideline for Testing of Chemicals 421 に準じ、経口投与を選択した。投与期間は、雄では交配前 14 日間、交配期間 14 日間、その後剖検前日までの 14 日間の計 42 日間、雌では交配前 14 日間、交配期間及び妊娠期間を通して授乳 4 日までとした。なお、雌については 42~45 日間の投与期間となった。投与回数は反復投与試験で一般的に行われている 1 回/日 (7 回/週) とした。

### 5.9 投与方法

投与方法は、げっ歯類の経口投与として一般的な強制経口投与とした。投与容量は 10 mL/kg 体重とし、1 日 1 回、08:48~11:38 の間にフレキシブル胃ゾンデを用いて投与液を投与した。ただし、投与時に分娩中であつた動物は分娩終了を待って 14:20~14:40 の間に投与した。対照群には媒体 (トウモロコシ油) のみを同様に投与した。個体ごとの投与液量は、最近時の体重を基に mL 単位で小数第二位を四捨五入して算出した。

### 5.10 投与量及び群構成

投与量は 40、200 及び 1000 mg/kg/day の 3 用量とし、対照群を加え 4 群構成とした。1 群当たりの動物数は雌雄各 12 匹とした。群構成表を以下に示した。

群構成表

| 試験群  | 投与量<br>(mg/kg) | 被験液濃度<br>(mg/mL) | 投与容量<br>(mL/kg) | 性 | 動物数 | 動物番号      |
|------|----------------|------------------|-----------------|---|-----|-----------|
| 対照群  | 0              | 0                | 10              | 雄 | 12  | 1001~1012 |
|      |                |                  |                 | 雌 | 12  | 1101~1112 |
| 低用量群 | 40             | 4                | 10              | 雄 | 12  | 2001~2012 |
|      |                |                  |                 | 雌 | 12  | 2101~2112 |
| 中用量群 | 200            | 20               | 10              | 雄 | 12  | 3001~3012 |
|      |                |                  |                 | 雌 | 12  | 3101~3112 |
| 高用量群 | 1000           | 100              | 10              | 雄 | 12  | 4001~4012 |
|      |                |                  |                 | 雌 | 12  | 4101~4112 |

### 5.11 投与量の設定根拠

本試験の投与量は、先に実施した「p-クロロベンズアルデヒドのラットにおける 28 日間反復経口投与毒性試験」<sup>2)</sup> (投与量：8、40、200 及び 1000 mg/kg) の結果を参考に設定した。28 日間反復経口投与毒性試験では、1000 mg/kg 投与群の雌雄において流涎あるいは振戦がみられ、雄の前肢握力及び雌の自発運動量の低下が認められた。また、同群雌雄において摂餌量が高値を示し、雄の体重増加抑制が認められた。一方、200 mg/kg 以下の投与群の一般状態、体重及び摂餌量には被験物質投与による顕著な影響は認められなかった。したがって、簡易生殖毒性試験における投与量は、雌雄の一般状態に明らかな毒性兆候の発現が予想される 1000 mg/kg を高用量とし、以下公比 5 で除して 200 及び 40 mg/kg をそれぞれ中及び低用量に設定した。

## 5.12 観察及び検査の方法

試験日の起算は、投与開始日を投与 1 日、投与 1 日から 7 日を投与 1 週、交尾成立日を妊娠 0 日、分娩終了日を授乳 0 日とし、以下に示す項目について、それぞれ記載の時期に観察及び検査を実施した。

### 5.12.1 一般状態の観察

投与期間中は毎日 3 回 (投与前、投与直後及び投与 1~3 時間後)、それぞれ体外表、栄養状態、姿勢、行動及び排泄物などの一般状態における異常の有無を観察した。なお、妊娠期間中の手に持つての観察は、妊娠 0、7、14 及び 20 日に行った。死亡動物は、発見後速やかに病理学検査 (5.12.8 項) に供した。

### 5.12.2 体重測定

雄は投与 1、4、8、11、15、18、22、25、29、32、36、39、42 日及び剖検日に、雌は投与 1、4、8、11、15 日、交配期間中週 2 回 (月曜、木曜)、妊娠 0、4、7、11、14、17 及び 20 日、授乳 0 及び 4 日並びに剖検日に体重を測定した。なお、測定は 08:24~10:43 の間に実施した。ただし、午後に分娩の終了が確認された個体の授乳 0 日の体重については 14:05~16:50 の間に測定した。

### 5.12.3 摂餌量測定

雄は投与 1、4、8、11、15、32、36、39 及び 42 日に、雌は投与 1、4、8、11 及び 15 日、妊娠 1、4、7、11、14、17 及び 20 日並びに授乳 2 及び 4 日に残餌量を測定し、前日の給餌量との差を 1 日摂餌量として算出した。給餌量及び残餌量ともに 08:21~11:03 の間に測定した。

### 5.12.4 膣垢検査

投与開始翌日から交尾が認められるまで毎日膣垢を採取し、交配前投与期間中は 5.4 試験動物の項と同様に性周期異常の有無を調べるとともに発情回数及び発情から次の発情までの日数 (性周期) を求めた。交配期間中は膣垢内の精子の有無を調べた。

### 5.12.5 交配方法

交配前投与期間終了後、同じ投与群の雌雄を 1:1 で終夜同居させ、翌朝、膣栓形成あるいは膣垢中に精子を確認したものを交尾成立とみなした。交配開始日を 0 日と起算して交尾までに要した日数を求めた。なお、同居期間は最長 2 週間と設定したが、5 日までに全例で交尾が成立した。ただし、高用量群については交配を行わず、投与 14 日に投与を中断し、雌雄全例について病理学検査 (5.12.8 項) に供した。

### 5.12.6 分娩及び哺育観察

交尾が成立した雌動物は、妊娠 21 日から妊娠 23 日の午前まで 1 日 2 回（午前、午後）分娩の有無並びにその終了を確認し、交尾成立日より分娩終了までの間を妊娠期間として 1 日単位で求めた。分娩が終了した母動物については、胎盤及び羊膜の処理等を指標として分娩異常の有無を観察した後、授乳 4 日まで出生児を哺育させた。授乳期間中は児集め、営巣及び授乳の状態等を指標として哺育異常の有無を観察し、授乳 5 日にエーテル麻酔下で腹大動脈切断により放血致死させ、病理学検査（5.12.8 項）に供した。授乳期間中に全ての出生児が死亡した動物については、その時点で同様に病理学検査に供した。

### 5.12.7 出生児の観察及び測定

母動物の分娩終了日を出生日（生後 0 日）とみなし、出生児数及び死産児数を数え、外表異常の有無を観察した。出生児は性別を判定した後、体重を測定した。授乳期間中は毎日 1 回、死亡児の有無を観察した。なお、死産児及び死亡児は廃棄した。

生後 4 日に体重を測定した後、全例をエーテル麻酔下で開腹し、腹大動脈切断により放血致死させ剖検を行い、体外表、胸部・腹部を含む器官・組織の異常の有無を肉眼的に調べた。なお、出生児の体重は個別に測定し、雌雄別に各腹の平均値を算出した。

### 5.12.8 病理学検査

#### 5.12.8.1 剖検及び器官重量測定

最終投与翌日にエーテル麻酔下で腹大動脈切断により放血致死させた後、体外表・頭部・胸部・腹部を含む全身の器官・組織の肉眼による詳細な病理解剖を行い、母動物については黄体数及び着床痕数を数えた。更に、精巣及び精巣上体については重量（絶対重量）を測定し、これらの器官について剖検日の体重から体重 100 g 当たりの相対重量を算出した。なお、精巣及び精巣上体の重量については左右別々に測定し、その合計値で評価した。

#### 5.12.8.2 病理組織学検査

精巣、精巣上体、前立腺、精囊、卵巣、子宮及び膣並びに肉眼的異常部位を個体識別部（耳標を装着した耳介）とともにリン酸緩衝 10 vol%ホルマリン液で固定・保存した（ただし、精巣及び精巣上体はブアン液で固定した後リン酸緩衝 10 vol%ホルマリン液に置換した）。個体識別部を除くこれらの器官は、パラフィン包埋した後、切片とし、ヘマトキシリン・エオジン（H・E）染色標本を作製した。鏡検は、対照群、中及び高用量群の全個体並びに全ての出生児が死亡した低用量群の 1 例（動物番号：2108）の上記内部生殖器並びに全ての肉眼的異常部位について行った結果、高用量群において精巣上体、前立腺、精囊及び膣に被験物質投与の影響が認められたため、更に低用量群のこれらの器官並びに肉眼的異常部位について鏡検した。なお、両側性の

器官については左右それぞれを鏡検し、精巣について被験物質投与の影響が認められなかったため、PAS 染色標本による検査は実施しなかった。

## 5.13 統計解析

### 5.13.1 パラメータの算出

以下の式により交尾率、授精率、受胎率及び出産率を群ごとに、妊娠期間、着床率、死産児率、外表異常率、出生率、生後 4 日生存率、生後 0 及び 4 日の性比を母動物ごとに算出した。なお、出生児の体重については母動物ごと雌雄別に平均値を求めた。

$$\text{交尾率(\%)} = (\text{交尾動物数} / \text{同居動物数}) \times 100$$

$$\text{授精率(\%)} = (\text{雌を妊娠させた雄の数} / \text{交尾した雄の数}) \times 100$$

$$\text{受胎率(\%)} = (\text{妊娠した雌の数} / \text{交尾した雌の数}) \times 100$$

$$\text{妊娠期間(日)} = \text{妊娠 0 日から分娩した日までの日数}$$

$$\text{出産率(\%)} = (\text{出生児出産雌数} / \text{妊娠雌数}) \times 100$$

$$\text{着床率(\%)} = (\text{着床痕数} / \text{黄体数}) \times 100$$

$$\text{死産児率(\%)} = (\text{死産児数} / \text{出生児数及び死産児数}) \times 100$$

$$\text{外表異常率(\%)} = (\text{外表異常児数} / \text{出生児数}) \times 100$$

$$\text{出生率(\%)} = (\text{出生児数} / \text{着床痕数}) \times 100$$

$$\text{生後 4 日生存率(\%)} = (\text{生後 4 日生存児数} / \text{出生児数}) \times 100$$

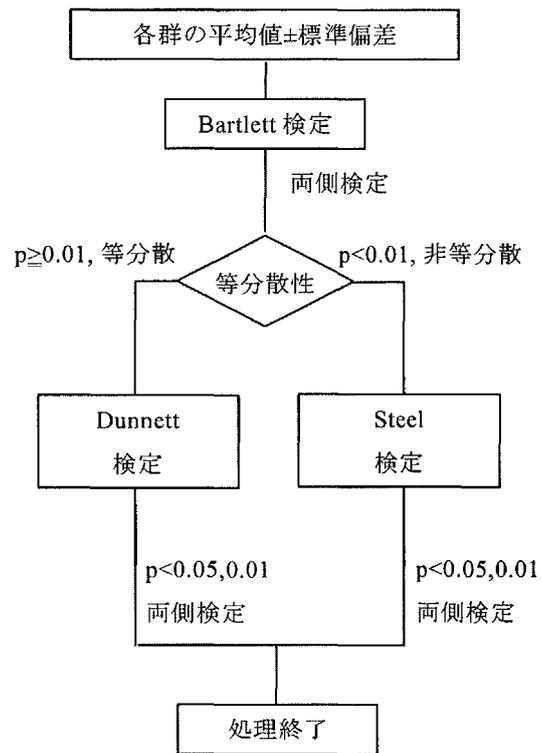
$$\text{生後 0 日の性比} = \text{雄出生児数} / \text{出生児数}$$

$$\text{生後 4 日の性比} = \text{生後 4 日の雄生存児数} / \text{生後 4 日の生存児数}$$

### 5.13.2 検定

データは対照群と各用量群との差について統計学的有意性の検定を行った。

体重、体重増加量（雄：投与 1~42 日、雌：投与 1~15 日、妊娠 0~20 日及び授乳 0~4 日、出生児：生後 0~4 日）、摂餌量、発情期像発現回数、性周期（発情周期）、交尾までに要した日数、妊娠期間、黄体数、着床痕数、生存児数、性比（生後 0 及び 4 日）及び器官重量（含、剖検時体重）は、群ごとに平均値及び標準偏差を求め、次に示す模式図の方法に従って検定した。なお、交配期間中の雌の体重及び 1000 mg/kg 投与群の精巣並びに精巣上体の重量については統計解析より除外した。



着床率、死産児率、外表異常率、出生率及び生後 4 日生存率については、群ごとに平均値及び標準偏差を求め、Steel 検定（有意水準 0.05 及び 0.01、両側）を行った。

交尾率、授精率、受胎率、出産率は、各群の交尾動物数、雌を妊娠させた雄動物数、妊娠雌動物数、生存児出産雌動物数より算出し、Fisher の直接確率計算法により検定（有意水準 0.05 及び 0.01、両側）を行った。

## 6. 試験結果

### 6.1 一般状態 (Table 1-1~1-5、Appendix 1-1~1-17)

1000 mg/kg 投与群の雌雄において投与4日以降、振戦及び自発運動の低下が1~4例、同群の雄では更に軟便が1例に認められ、投与9日までに雄9例、雌7例が死亡した。一方、200 mg/kg 以下の投与群では40 mg/kg 投与群の雄1例に投与15~21日の間、切歯破損がみられたが、その他には異常は認められず、被験物質投与に起因した異常は認められなかった。また、哺育状態に関しても異常は認められなかった。

### 6.2 体重 (Fig. 1、2、Table 2-1~2-4、Appendix 2-1~2-14)

1000 mg/kg 投与群において雌雄とも投与1日から4日の間に体重減少がみられ、雄では投与4日以降の体重が対照群と比べ有意な低値を示した。なお、1000 mg/kg 投与群の雌では交配前投与期間中の体重増加量が対照群と比べ有意な高値を示したが、死亡による例数の減少に伴う偶発的な変化と考えられた。一方、40及び200 mg/kg 投与群では雌雄とも投与期間中を通して対照群と同様な体重推移を示し、各測定日の体重並びに体重増加量ともに有意な差は認められなかった。

### 6.3 摂餌量 (Fig. 3、4、Table 3-1~3-4、Appendix 3-1~3-14)

1000 mg/kg 投与群において雄の投与4日、雌の投与4及び8日の摂餌量が対照群と比べ有意な低値を示した。なお、1000 mg/kg 投与群の雌では投与11及び15日の摂餌量が対照群と比べ有意な高値を示したが、死亡による例数の減少に伴う偶発的な変化と考えられた。一方、40及び200 mg/kg では雌雄とも対照群と同様な摂餌量を示し、いずれの測定日の摂餌量にも有意な差は認められなかった。

### 6.4 器官重量 (Table 4、Appendix 4-1~4-3)

40及び200mg/kg 投与群の精巣及び精巣上体いずれも絶対及び相対重量ともに対照群と比べ有意な差は認められなかった。

### 6.5 剖検所見 (Table 5-1~5-4、Appendix 5-1~5-96)

1000 mg/kg 投与群の死亡例において脾臓の小型化が雌雄各2例、腺胃に暗赤色巣が雄3例及び雌2例、前胃に隆起巣が雄1例、肺の暗調化巣が雄1例に認められた。同群の投与14日に投与を中断して剖検した雌1例には、子宮に硬化巣及び腔に赤色粘液貯留が認められたが、本例を除いて他の例に同様な所見は認められず、偶発的な変化であった。200 mg/kg 投与群では、雄1例に精巣上体の白色巣、雌1例に心臓の白色巣が認められたが、その他には200 mg/kg 以下の投与群において肉眼的な異常は認められなかった。

#### 6.6 病理組織学検査 (Table 6-1~6-4、Appendix 5-1~5-96)

1000 mg/kg 投与群の死亡例において精巣上体頭部の精巣上体管上皮細胞の単細胞壊死が 3 例、前立腺腹葉の上皮細胞の単細胞壊死が 6 例、精囊の上皮細胞の単細胞壊死が 3 例、膈上皮細胞の粘液細胞化が 2 例にみられた。更に肉眼的所見に関連し、脾臓の萎縮が雌雄各 2 例、腺胃のびらんが雄 3 例、雌 2 例、前胃の粘膜変性が雄 1 例にみられた。なお、肉眼的所見として暗調化巣が認められた雄 1 例の肺にはこれに相当する組織所見はみられなかった。同群の投与 14 日に投与を中断して剖検した 1000 mg/kg 投与群の雌では、膈上皮細胞の粘液細胞化が全例 (5 例) にみられた他、肉眼的所見として子宮に硬化巣及び膈に赤色粘液貯留が認められた個体には、子宮の脱落膜腫がみられた。200 mg/kg 以下の投与群では、肉眼的所見として精巣上体の白色巣が認められた雄 1 例に精子肉芽腫、心臓の白色巣が認められた雌 1 例には心筋変性がみられた他、肉眼的異常が認められなかった雄の精巣上体、前立腺及び精囊に組織所見がみられたが、軽微あるいは軽度な変化であり、投与量との関連性のない発現状況であった。

#### 6.7 性周期 (Table 7、Appendix 6-1~6-4)

40 及び 200 mg/kg 投与群では、発情回数及び性周期ともに対照群との間に有意な差は認められなかった。1000 mg/kg 投与群では、死亡発現により性周期を観察しえた例数は 5 例に過ぎないが、これらの内 4 例では投与 2 週において連続休止期像を示した。

#### 6.8 交配成績 (Table 8、Appendix 7-1~7-3)

対照群を含め 40 及び 200 mg/kg 投与群の雌雄全例において交尾が成立し、交尾した雌全例が妊娠し、交尾率、授精率及び受胎率とも 100%であった。また、交尾までに要した日数に対照群と両投与群との間に有意な差は認められなかった。

#### 6.9 分娩成績 (Table 9、Appendix 8-1~8-3)

対照群を含め 40 及び 200 mg/kg 投与群の全例が正常に分娩し、出産率、妊娠期間、黄体数、着床痕数、着床率、死産児率、出生児数及び出生率のいずれにも対照群と両投与群との間に有意な差は認められなかった。

#### 6.10 出生児の性比及び外表観察 (Table 10、Appendix 9-1~9-3)

出生児の生後 0 及び 4 日における性比には対照群と 40 及び 200 mg/kg 投与群との間に有意な差は認められなかった。外表異常を有する出生児はいずれの群にも認められなかった。

#### 6.11 出生児の生存率 (Table 11、Appendix 10-1~10-3)

40 及び 200 mg/kg 投与群の各 1 腹 (動物番号: 2108、3108) は生後 1 及び 2 日までに全ての出生児が死亡した。しかし、これらを除く腹では生後 4 日生存率は 83.3%以

R-1070 (訂正版)

上と良好であり、対照群と両投与群との間に有意な差は認められなかった。

#### 6.12 出生児の体重 (Table 12、Appendix 11-1~11-3)

40 及び 200 mg/kg 投与群の雌雄とも出生日及び生後 4 日の体重に対照群と比べ有意な差は認められなかった。

#### 6.13 出生児の生後 4 日剖検所見 (Table 13、Appendix 12-1~12-3)

対照群を含め 40 及び 200 mg/kg 投与群とも出生児の体外表、胸部・腹部を含む器官・組織に肉眼的異常はみられなかった。

## 7. 考察

4-クロロベンズアルデヒドを 0 (対照群：トウモロコシ油)、40、200 及び 1000 mg/kg/day の投与量で、Sprague-Dawley 系 SPF ラットの、雄に交配前 14 日間及び交配期間を通して剖検前日まで、雌には交配前 14 日間及び交配期間並びに妊娠期間を通して授乳 4 日まで経口投与し、雌雄動物に対する影響、特に生殖発生毒性について概略的に検討した。なお、1000 mg/kg 投与群では、雌雄とも交配前投与期間中に死亡が多発し、生殖発生に関する評価に耐えないと判断されたため、投与 14 日に投与を中断して生存雌雄全例を病理検査に付した。

### 7.1 雌雄動物に対する影響

1000 mg/kg 投与群の雄 9 例及び雌 7 例が投与 9 日までに死亡した。これらの死亡動物では振戦及び自発運動の低下などの一般状態変化がみられた。同群の体重は雌雄ともに投与初期に減少を示し、摂餌量が低値を示した。病理組織学検査では、死亡例において雄では精巣上体頭部の精巣上体管に上皮細胞の単細胞壊死、前立腺腹葉に上皮細胞の単細胞壊死、精囊に上皮細胞の単細胞壊死、脾臓の萎縮、腺胃のびらん及び前胃粘膜の変性、雌では膈上皮細胞の粘液細胞化、脾臓の萎縮及び腺胃のびらんがみられた。また、投与を中断した雌において膈に上皮細胞の粘液細胞化がみられた他、子宮に脱落膜腫がみられた。これらの組織所見の内、腺胃及び前胃にみられた所見は、先に実施された 28 日間経口投与試験<sup>2)</sup>においても観察されており、被験物質の刺激に伴う変化と推察された。一方、内部生殖器にみられた組織所見は、28 日間経口投与試験<sup>2)</sup>においては観察されておらず、発生機序は不明であった。しかし、本試験では 28 日間経口投与試験では認められなかった死亡が多発しており、4-クロロベンズアルデヒドの 1000 mg/kg の用量は、ラットを死に至らしめるとともに、上記の組織変化を惹起したものと考えられた。200 mg/kg 以下の投与群では死亡はみられず、一般状態、体重、摂餌量及び病理学検査に被験物質投与に起因した変化あるいは異常は認められなかった。

### 7.2 生殖発生に対する影響

1000 mg/kg 投与群では、投与 14 日まで観察し得た雌 5 例中 4 例の膈垢像は投与 2 週において連続休止期像を示し、性周期の異常が認められた。一方、40 及び 200 mg/kg 投与群では雌雄動物の交尾までに要した日数、交尾率、授精率及び受胎率に被験物質投与の影響を示唆する変化は認められなかった。これら交配成績に加え、雌雄内部生殖器に関する病理組織学検査では、被験物質投与に起因した変化は認められなかったことから、4-クロロベンズアルデヒドの 200 mg/kg/day 投与は、精子形成及び排卵などの性腺機能、交尾から受胎に至る雌雄動物の生殖機能に影響を及ぼさないと考えられた。

分娩及び哺育状態に被験物質投与に起因した異常は認められず、出産率、妊娠期間、

## R-1070 (訂正版)

黄体数、着床痕数、着床率、死産児率、出生児数、出生率に被験物質投与の影響を示唆する変化は認められなかった。したがって、4-クロロベンズアルデヒドの 200 mg/kg/day 投与は、妊娠維持、分娩及び哺育などの妊娠母体の機能に対して影響を及ぼさないと考えられた。

出生児に関し、出生日及び生後 4 日の体重及び性比並びに被験物質投与の影響を示唆する変化は認められず、出生児の外表及び剖検所見に被験物質投与に起因した異常は認められなかった。なお、40 及び 200 mg/kg 投与群の各 1 腹において出生児全例が生後 4 日までに死亡した。しかし、この様な例は 2 例に限られ、両群とも生後 4 日生存率は当施設の背景データの範囲内 (88.0~100.0%、2005~2010 年、16 試験) であることから全児死亡母体の発現は被験物質投与とは関連しないと考えられた。

これらの結果から、本試験条件下における 4-クロロベンズアルデヒドの雌雄動物に対する及び無影響量及び無毒性量はともに 200 mg/kg/day と推察され、一方、交尾から受胎に至る雌雄動物の生殖機能並びに母体機能としての妊娠の維持、分娩及び哺育並びに出生児に対して本被験物質の 200 mg/kg/day 投与は影響を及ぼさないと考えられた。

R-1070 (訂正版)

## 8. 文献

- 1) HPLC を用いた 4-クロロベンズアルデヒドの被験液中濃度測定法バリデーション (媒体: トウモロコシ油)、(株式会社ボゾリサーチセンター、試験番号: A-2314、2010 年)
  
- 2) 4-クロロベンズアルデヒドのラットにおける 28 日間反復経口投与毒性試験、(株式会社 化合物安全性研究所、試験番号: SR07047、進行中)

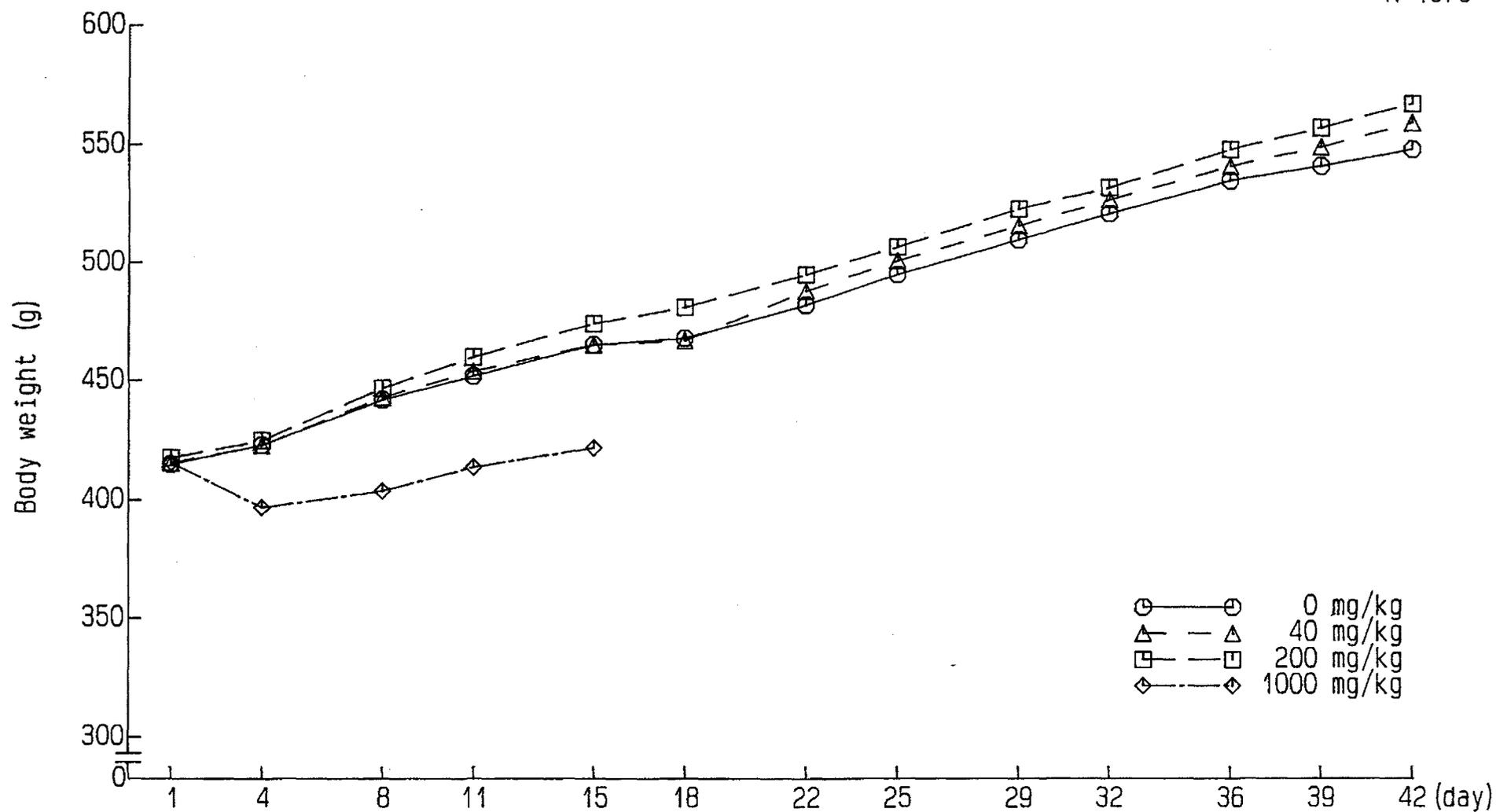


Fig.1 A reproduction/developmental toxicity screening test in rats treated orally with 4-Chlorobenzaldehyde  
Body weight of male rats

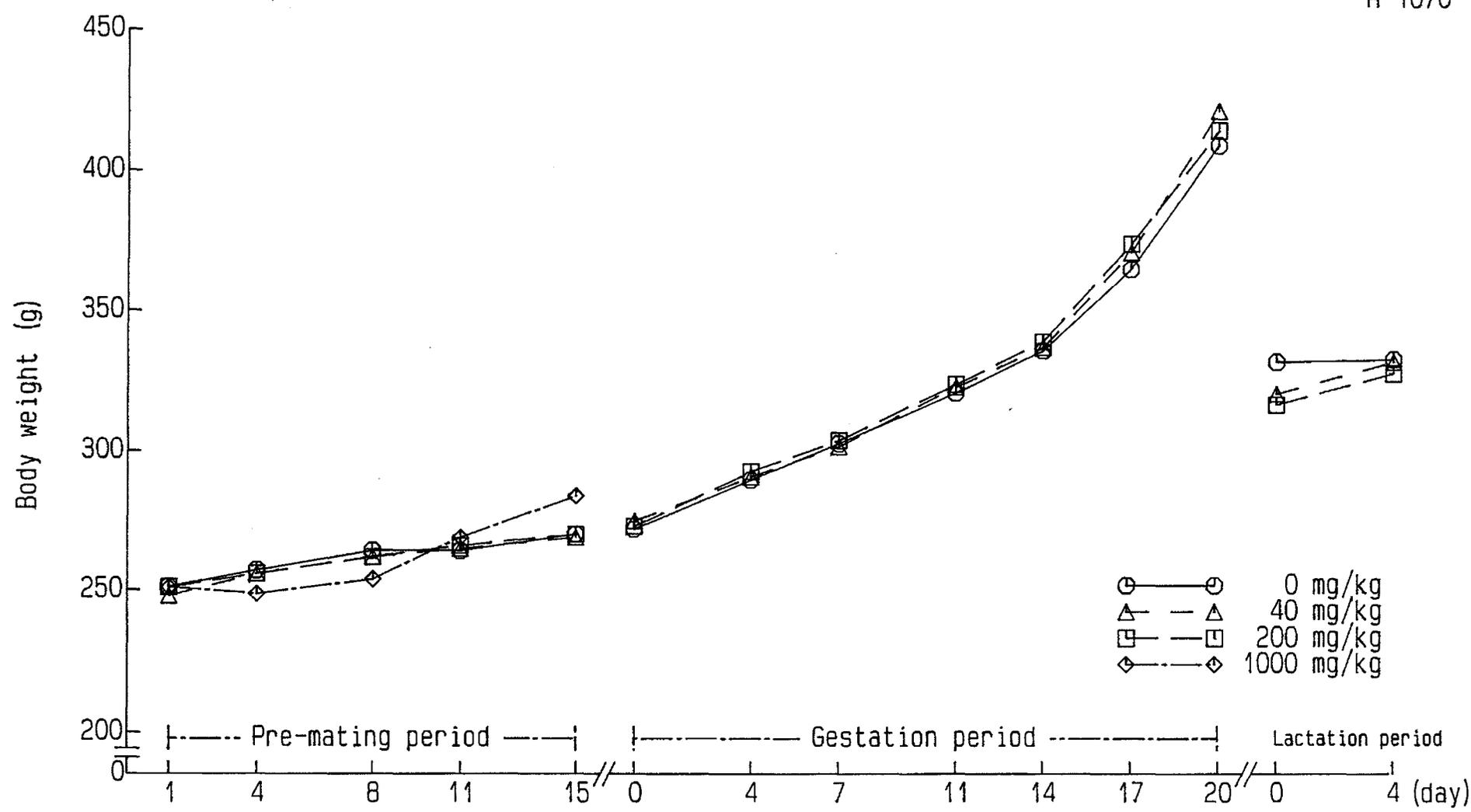


Fig.2 A reproduction/developmental toxicity screening test in rats treated orally with 4-Chlorobenzaldehyde  
Body weight of female rats

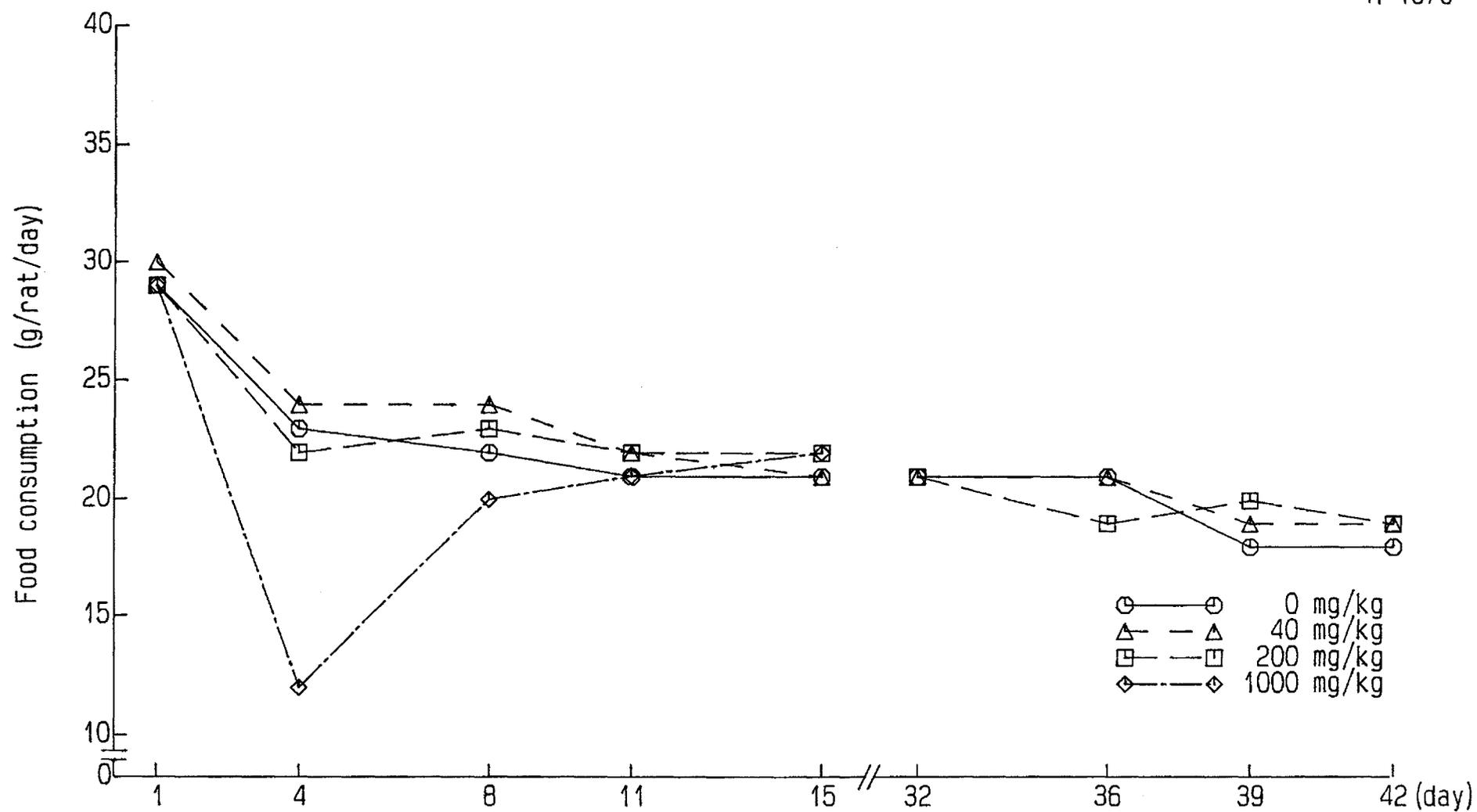


Fig.3 A reproduction/developmental toxicity screening test in rats treated orally with 4-Chlorobenzaldehyde  
Food consumption of male rats

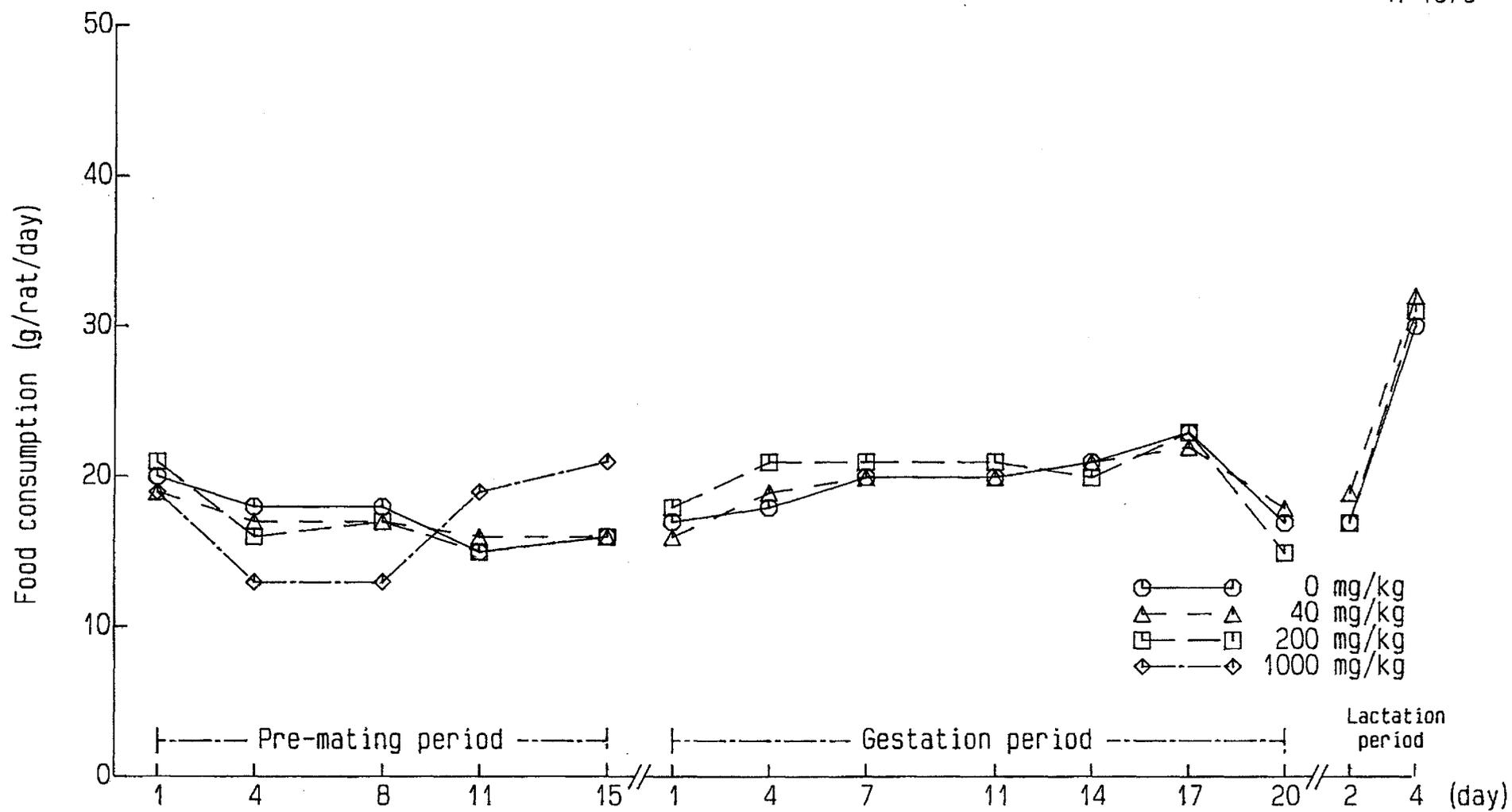


Fig.4 A reproduction/developmental toxicity screening test in rats treated orally with 4-Chlorobenzaldehyde

Food consumption of female rats

Table 1-1 A reproduction/developmental toxicity screening test in rats treated orally with 4-Chlorobenzaldehyde  
Clinical signs in male rats

| Dose<br>mg/kg | Signs                                 | Administration (day) |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |
|---------------|---------------------------------------|----------------------|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|
|               |                                       | 1                    | 2  | 3  | 4  | 5  | 6  | 7  | 8  | 9  | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 | 21 |
| 0             | No. of animals                        | 12                   | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 |    |
|               | No. of animals with abnormal findings | 0                    | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  |
| 40            | No. of animals                        | 12                   | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 |    |
|               | No. of animals with abnormal findings | 0                    | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 1  | 1  | 1  | 1  | 1  | 1  | 1  |
|               | Fracture of incisors                  | 0                    | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 1  | 1  | 1  | 1  | 1  | 1  | 1  |
| 200           | No. of animals                        | 12                   | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 |    |
|               | No. of animals with abnormal findings | 0                    | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  |
| 1000 a)       | No. of animals                        | 12                   | 12 | 12 | 12 | 12 | 7  | 6  | 3  | 3  | 3  | 3  | 3  | 3  | 3  | 0  |    |    |    |    |    |    |
|               | No. of animals with abnormal findings | 0                    | 0  | 0  | 3  | 8  | 3  | 3  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  |    |    |    |    |    |    |    |
|               | Tremor                                | 0                    | 0  | 0  | 3  | 4  | 1  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  |    |    |    |    |    |    |    |
|               | Decrease in spontaneous movement      | 0                    | 0  | 0  | 0  | 2  | 2  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  |    |    |    |    |    |    |    |
|               | Soft feces                            | 0                    | 0  | 0  | 0  | 0  | 1  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  |    |    |    |    |    |    |    |
|               | Dead                                  | 0                    | 0  | 0  | 0  | 5  | 1  | 3  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  |    |    |    |    |    |    |    |

a): This group was subjected to necropsy on day 15 of administration.

Table 1-2

A reproduction/developmental toxicity screening test in rats treated orally with  
4-Chlorobenzaldehyde

Clinical signs in male rats

| Dose<br>mg/kg | Signs                                 | Administration (day) |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |      |
|---------------|---------------------------------------|----------------------|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|------|
|               |                                       | 22                   | 23 | 24 | 25 | 26 | 27 | 28 | 29 | 30 | 31 | 32 | 33 | 34 | 35 | 36 | 37 | 38 | 39 | 40 | 41 | 42 | 43a) |
| 0             | No. of animals                        | 12                   | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 |      |
|               | No. of animals with abnormal findings | 0                    | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0    |
| 40            | No. of animals                        | 12                   | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12   |
|               | No. of animals with abnormal findings | 0                    | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0    |
| 200           | No. of animals                        | 12                   | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12   |
|               | No. of animals with abnormal findings | 0                    | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0    |

a): Day of necropsy

Table 1-3 A reproduction/developmental toxicity screening test in rats treated orally with 4-Chlorobenzaldehyde  
Clinical signs in female rats during the pre-mating period

| Dose<br>mg/kg | Signs                                 | Administration (day) |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |
|---------------|---------------------------------------|----------------------|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|
|               |                                       | 1                    | 2  | 3  | 4  | 5  | 6  | 7  | 8  | 9  | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 |
| 0             | No. of animals                        | 12                   | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 |
|               | No. of animals with abnormal findings | 0                    | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  |
| 40            | No. of animals                        | 12                   | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 |
|               | No. of animals with abnormal findings | 0                    | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  |
| 200           | No. of animals                        | 12                   | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 |
|               | No. of animals with abnormal findings | 0                    | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  |
| 1000 a)       | No. of animals                        | 12                   | 12 | 12 | 12 | 11 | 10 | 9  | 9  | 6  | 5  | 5  | 5  | 5  | 5  | 5  |
|               | No. of animals with abnormal findings | 0                    | 0  | 0  | 2  | 2  | 1  | 3  | 3  | 1  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  |
|               | Tremor                                | 0                    | 0  | 0  | 1  | 1  | 0  | 1  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  |
|               | Decrease in spontaneous movement      | 0                    | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 2  | 1  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  |
|               | Dead                                  | 0                    | 0  | 0  | 1  | 1  | 1  | 0  | 3  | 1  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  |

a) : This group was subjected to necropsy on day 15 of administration.

Table 1-4

A reproduction/developmental toxicity screening test in rats treated orally with  
4-Chlorobenzaldehyde

Clinical signs in dams during the gestation period

| Dose<br>mg/kg | Signs                              | Administration |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |      |
|---------------|------------------------------------|----------------|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|------|
|               |                                    | 0              | 1  | 2  | 3  | 4  | 5  | 6  | 7  | 8  | 9  | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 | 21 | 22 | 23a) |
| 0             | No. of dams                        | 12             | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 5  | 0    |
|               | No. of dams with abnormal findings | 0              | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0    |
| 40            | No. of dams                        | 12             | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 2  | 0    |
|               | No. of dams with abnormal findings | 0              | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0    |
| 200           | No. of dams                        | 12             | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 3  | 0    |
|               | No. of dams with abnormal findings | 0              | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0    |

a): Gestation day

Table 1-5                      A reproduction/developmental toxicity screening test in rats treated orally with  
4-Chlorobenzaldehyde

Clinical signs in dams during the lactation period

| Dose<br>mg/kg | Signs                              | Administration |    |                  |                  |    |     |
|---------------|------------------------------------|----------------|----|------------------|------------------|----|-----|
|               |                                    | 0              | 1  | 2                | 3                | 4  | 5a) |
| 0             | No. of dams                        | 12             | 12 | 12               | 12               | 12 | 12  |
|               | No. of dams with abnormal findings | 0              | 0  | 0                | 0                | 0  | 0   |
| 40            | No. of dams                        | 12             | 12 | 11 <sup>b)</sup> | 11               | 11 | 11  |
|               | No. of dams with abnormal findings | 0              | 0  | 0                | 0                | 0  | 0   |
| 200           | No. of dams                        | 12             | 12 | 12               | 11 <sup>c)</sup> | 11 | 11  |
|               | No. of dams with abnormal findings | 0              | 0  | 0                | 0                | 0  | 0   |

a): Lactation day

b): One dam was necropsied on day 1 of lactation because all pups died.

c): One dam was necropsied on day 2 of lactation because all pups died.

Table 2-1 A reproduction/developmental toxicity screening test in rats treated orally with 4-Chlorobenzaldehyde

Body weight of male rats

| Dose<br>mg/kg |      | Pre-mating period |       |                 |      |      | Mating period |     |     |     | Post-mating period |     |     |      | Gain<br>1-42 |
|---------------|------|-------------------|-------|-----------------|------|------|---------------|-----|-----|-----|--------------------|-----|-----|------|--------------|
|               |      | 1                 | 4     | 8               | 11   | 15   | 18            | 22  | 25  | 29  | 32                 | 36  | 39  | 42a) |              |
| 0             | No.  | 12                | 12    | 12              | 12   | 12   | 12            | 12  | 12  | 12  | 12                 | 12  | 12  | 12   | 12           |
|               | Mean | 415               | 423   | 442             | 452  | 465  | 468           | 482 | 495 | 510 | 521                | 535 | 541 | 548  | 133          |
|               | S.D. | 17                | 17    | 21              | 24   | 26   | 24            | 28  | 31  | 33  | 34                 | 35  | 34  | 33   | 21           |
| 40            | No.  | 12                | 12    | 12              | 12   | 12   | 12            | 12  | 12  | 12  | 12                 | 12  | 12  | 12   | 12           |
|               | Mean | 416               | 423   | 443             | 454  | 465  | 467           | 488 | 501 | 516 | 527                | 541 | 549 | 559  | 142          |
|               | S.D. | 16                | 18    | 19              | 22   | 25   | 28            | 24  | 25  | 25  | 26                 | 28  | 28  | 29   | 19           |
| 200           | No.  | 12                | 12    | 12              | 12   | 12   | 12            | 12  | 12  | 12  | 12                 | 12  | 12  | 12   | 12           |
|               | Mean | 418               | 425   | 447             | 460  | 474  | 481           | 495 | 507 | 523 | 532                | 548 | 557 | 567  | 149          |
|               | S.D. | 18                | 18    | 20              | 21   | 22   | 21            | 25  | 24  | 25  | 24                 | 26  | 26  | 28   | 15           |
| 1000 b)       | No.  | 12                | 12    | 3 <sup>c)</sup> | 3    | 3    | 0             |     |     |     |                    |     |     |      |              |
|               | Mean | 416               | 397** | 404*            | 414* | 422* |               |     |     |     |                    |     |     |      |              |
|               | S.D. | 16                | 15D   | 13D             | 19D  | 20D  |               |     |     |     |                    |     |     |      |              |

Unit: g

No.: No. of animals

a): Day of administration

b): This group was subjected to necropsy on day 15 of administration.

c): Five animals(Animal number 4002,4004,4008,4009 and 4012) died on day 5 administration, and one animal(Animal number 4006) died on day 6 of administration, and three animals(Animal number 4003,4010 and 4011) died on day 7 administration.

\*: p<0.05; \*\*: p<0.01 (Significant difference from control group)

D: Dunnett's test

Table 2-2 A reproduction/developmental toxicity screening test in rats treated orally with 4-Chlorobenzaldehyde

Body weight of female rats during the pre-mating period

| Dose<br>mg/kg |      | Administration (day) |                  |                 |                 |     | Gain<br>1-15 |
|---------------|------|----------------------|------------------|-----------------|-----------------|-----|--------------|
|               |      | 1                    | 4                | 8               | 11              | 15  |              |
| 0             | No.  | 12                   | 12               | 12              | 12              | 12  | 12           |
|               | Mean | 251                  | 257              | 264             | 264             | 270 | 19           |
|               | S.D. | 9                    | 11               | 12              | 14              | 15  | 10           |
| 40            | No.  | 12                   | 12               | 12              | 12              | 12  | 12           |
|               | Mean | 248                  | 256              | 262             | 265             | 269 | 21           |
|               | S.D. | 7                    | 9                | 9               | 9               | 10  | 6            |
| 200           | No.  | 12                   | 12               | 12              | 12              | 12  | 12           |
|               | Mean | 251                  | 256              | 262             | 266             | 270 | 19           |
|               | S.D. | 8                    | 9                | 12              | 12              | 13  | 10           |
| 1000 a)       | No.  | 12                   | 11 <sup>b)</sup> | 7 <sup>c)</sup> | 5 <sup>d)</sup> | 5   | 5            |
|               | Mean | 251                  | 249              | 254             | 269             | 284 | 34*          |
|               | S.D. | 9                    | 11               | 13              | 12              | 14  | 15D          |

Unit: g

No.: No. of animals

a): This group was subjected to necropsy on day 15 of administration.

b): One animal(Animal number 4110) died on day 4 of administration.

c): One animal(Animal number 4104) died on day 5 of administration, and one animal(Animal number 4111) died on day 6 of administration and two animals(Animal number 4103 and 4112) died on day 8 of administration.

d): One animal(Animal number 4107) died on day 8 of administration, and one animal(Animal number 4109) died on day 9 of administration.

\*:  $p < 0.05$  (Significant difference from control group)

D: Dunnett's test

Table 2-3 A reproduction/developmental toxicity screening test in rats treated orally with 4-Chlorobenzaldehyde  
Body weight of dams during the gestation period

| Dose<br>mg/kg |      | Administration |     |     |     |     |     |      | Gain<br>0-20 |
|---------------|------|----------------|-----|-----|-----|-----|-----|------|--------------|
|               |      | 0              | 4   | 7   | 11  | 14  | 17  | 20a) |              |
| 0             | No.  | 12             | 12  | 12  | 12  | 12  | 12  | 12   | 12           |
|               | Mean | 272            | 290 | 303 | 321 | 336 | 365 | 409  | 137          |
|               | S.D. | 14             | 15  | 18  | 14  | 16  | 21  | 26   | 24           |
| 40            | No.  | 12             | 12  | 12  | 12  | 12  | 12  | 12   | 12           |
|               | Mean | 275            | 291 | 302 | 323 | 337 | 371 | 421  | 146          |
|               | S.D. | 9              | 10  | 9   | 11  | 12  | 11  | 13   | 13           |
| 200           | No.  | 12             | 12  | 12  | 12  | 12  | 12  | 12   | 12           |
|               | Mean | 273            | 293 | 304 | 324 | 339 | 374 | 414  | 141          |
|               | S.D. | 9              | 10  | 12  | 12  | 15  | 16  | 20   | 20           |

Unit: g

No.: No. of dams

a): Gestation day

No significant difference in any treated groups from control group

Table 2-4

A reproduction/developmental toxicity screening test in rats treated orally with  
4-Chlorobenzaldehyde

Body weight of dams during the lactation period

| Dose<br>mg/kg |      | Administration |                  | Gain<br>0-4 |
|---------------|------|----------------|------------------|-------------|
|               |      | 0              | 4a)              |             |
| 0             | No.  | 12             | 12               | 12          |
|               | Mean | 332            | 333              | 1           |
|               | S.D. | 23             | 28               | 12          |
| 40            | No.  | 12             | 11 <sup>b)</sup> | 11          |
|               | Mean | 321            | 332              | 7           |
|               | S.D. | 25             | 23               | 18          |
| 200           | No.  | 12             | 11 <sup>c)</sup> | 11          |
|               | Mean | 317            | 328              | 8           |
|               | S.D. | 22             | 19               | 20          |

Unit: g

No.: No. of dams

a): Lactation day

b): One dam was necropsied on lactation day 1 because all pups died.

c): One dam was necropsied on lactation day 2 because all pups died.

No significant difference in any treated groups from control group

Table 3-1 A reproduction/developmental toxicity screening test in rats treated orally with 4-Chlorobenzaldehyde  
Food consumption of male rats

| Dose<br>mg/kg |      | Pre-mating period |      |                 |    |    | Post-mating period |    |    |      |
|---------------|------|-------------------|------|-----------------|----|----|--------------------|----|----|------|
|               |      | 1                 | 4    | 8               | 11 | 15 | 32                 | 36 | 39 | 42a) |
| 0             | No.  | 12                | 12   | 12              | 12 | 12 | 12                 | 12 | 12 | 12   |
|               | Mean | 29                | 23   | 22              | 21 | 21 | 21                 | 21 | 18 | 18   |
|               | S.D. | 2                 | 3    | 2               | 3  | 3  | 3                  | 3  | 3  | 2    |
| 40            | No.  | 12                | 12   | 12              | 12 | 12 | 12                 | 12 | 12 | 12   |
|               | Mean | 30                | 24   | 24              | 22 | 21 | 21                 | 21 | 19 | 19   |
|               | S.D. | 3                 | 3    | 3               | 2  | 4  | 2                  | 2  | 2  | 2    |
| 200           | No.  | 12                | 12   | 12              | 12 | 12 | 12                 | 12 | 12 | 12   |
|               | Mean | 29                | 22   | 23              | 22 | 22 | 21                 | 19 | 20 | 19   |
|               | S.D. | 2                 | 2    | 2               | 2  | 2  | 2                  | 2  | 2  | 2    |
| 1000 b)       | No.  | 12                | 12   | 3 <sup>c)</sup> | 3  | 3  | 0                  |    |    |      |
|               | Mean | 29                | 12** | 20              | 21 | 22 |                    |    |    |      |
|               | S.D. | 3                 | 5ST  | 1               | 2  | 2  |                    |    |    |      |

Unit: g/rat/day

No.: No. of animals

a): Day of administration

b): This group was subjected to necropsy on day 15 of administration.

c): Five animals (Animal number 4002, 4004, 4008, 4009 and 4012) died on day 5 administration, and one animal (Animal number 4006) died on day 6 of administration, and three animals (Animal number 4003, 4010 and 4011) died on day 7 administration.

\*\* : p<0.01 (Significant difference from control group)

ST: Steel's test

Table 3-2

A reproduction/developmental toxicity screening test in rats treated orally with  
4-Chlorobenzaldehyde

Food consumption of female rats during the pre-mating period

| Dose<br>mg/kg |      | Administration (day) |                  |                 |                 |      |
|---------------|------|----------------------|------------------|-----------------|-----------------|------|
|               |      | 1                    | 4                | 8               | 11              | 15   |
| 0             | No.  | 12                   | 12               | 12              | 12              | 12   |
|               | Mean | 20                   | 18               | 18              | 15              | 16   |
|               | S.D. | 2                    | 2                | 1               | 3               | 3    |
| 40            | No.  | 12                   | 12               | 12              | 12              | 12   |
|               | Mean | 19                   | 17               | 17              | 16              | 16   |
|               | S.D. | 3                    | 2                | 2               | 3               | 3    |
| 200           | No.  | 12                   | 12               | 12              | 12              | 12   |
|               | Mean | 21                   | 16               | 17              | 15              | 16   |
|               | S.D. | 3                    | 3                | 3               | 3               | 3    |
| 1000 a)       | No.  | 12                   | 11 <sup>b)</sup> | 7 <sup>c)</sup> | 5 <sup>d)</sup> | 5    |
|               | Mean | 19                   | 13**             | 13*             | 19*             | 21** |
|               | S.D. | 3                    | 3D               | 7ST             | 4D              | 2D   |

Unit: g/rat/day

No.: No. of animals

a): This group was subjected to necropsy on day 15 of administration.

b): One animal(Animal number 4110) died on day 4 of administration.

c): One animal(Animal number 4104) died on day 5 of administration, and one animal(Animal number 4111) died on day 6 of administration  
and two animals(Animal number 4103 and 4112) died on day 8 of administration.

d): One animal(Animal number 4107) died on day 8 of administration, and one animal(Animal number 4109) died on day 9 of administration.

\*: p<0.05; \*\*: p<0.01 (Significant difference from control group)

D: Dunnett's test

ST: Steel's test

Table 3-3 A reproduction/developmental toxicity screening test in rats treated orally with 4-Chlorobenzaldehyde  
Food consumption of dams during the gestation period

| Dose<br>mg/kg |      | Administration |    |    |    |    |    |      |
|---------------|------|----------------|----|----|----|----|----|------|
|               |      | 1              | 4  | 7  | 11 | 14 | 17 | 20a) |
| 0             | No.  | 12             | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12   |
|               | Mean | 17             | 18 | 20 | 20 | 21 | 23 | 17   |
|               | S.D. | 3              | 4  | 3  | 3  | 3  | 3  | 2    |
| 40            | No.  | 12             | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12   |
|               | Mean | 16             | 19 | 20 | 20 | 21 | 22 | 18   |
|               | S.D. | 3              | 2  | 2  | 3  | 2  | 4  | 3    |
| 200           | No.  | 12             | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12   |
|               | Mean | 18             | 21 | 21 | 21 | 20 | 23 | 15   |
|               | S.D. | 2              | 3  | 3  | 2  | 2  | 3  | 3    |

Unit: g/rat/day

No.: No. of dams

a): Gestation day

No significant difference in any treated groups from control group

Table 3-4                      A reproduction/developmental toxicity screening test in rats treated orally with  
4-Chlorobenzaldehyde

Food consumption of dams during the lactation period

| Dose<br>mg/kg |      | Administration   |     |
|---------------|------|------------------|-----|
|               |      | 2                | 4a) |
| 0             | No.  | 12               | 12  |
|               | Mean | 17               | 30  |
|               | S.D. | 7                | 10  |
| 40            | No.  | 11 <sup>b)</sup> | 11  |
|               | Mean | 19               | 32  |
|               | S.D. | 8                | 7   |
| 200           | No.  | 11 <sup>c)</sup> | 11  |
|               | Mean | 17               | 31  |
|               | S.D. | 7                | 7   |

Unit: g/rat/day

No.: No. of dams

a): Lactation day

b): One dam was necropsied on lactation day 1 because all pups died.

c): One dam was necropsied on lactation day 2 because all pups died.

No significant difference in any treated groups from control group

Table 4                      A reproduction/developmental toxicity screening test in rats treated orally with  
4-Chlorobenzaldehyde  
Organ weight of male rats

| Dose     |     |      | Body   | Testes       | Epididymides   |
|----------|-----|------|--------|--------------|----------------|
| mg/kg    |     |      | weight | (R+L)        | (R+L)          |
|          |     |      | g      | g(g/100g BW) | mg(mg/100g BW) |
| Absolute | 0   | No.  | 12     | 12           | 12             |
|          |     | Mean | 553    | 3.63         | 1350           |
|          |     | S.D. | 34     | 0.21         | 75             |
|          | 40  | No.  | 12     | 12           | 12             |
|          |     | Mean | 563    | 3.42         | 1289           |
|          |     | S.D. | 29     | 0.46         | 146            |
|          | 200 | No.  | 12     | 12           | 12             |
|          |     | Mean | 569    | 3.58         | 1363           |
|          |     | S.D. | 26     | 0.26         | 71             |
| Relative | 0   | No.  |        | 12           | 12             |
|          |     | Mean |        | 0.66         | 245            |
|          |     | S.D. |        | 0.04         | 17             |
|          | 40  | No.  |        | 12           | 12             |
|          |     | Mean |        | 0.61         | 229            |
|          |     | S.D. |        | 0.08         | 25             |
|          | 200 | No.  |        | 12           | 12             |
|          |     | Mean |        | 0.63         | 240            |
|          |     | S.D. |        | 0.05         | 14             |

No significant difference in any treated groups from control group

Table 5-1

A reproduction/developmental toxicity screening test in rats  
treated orally with 4-Chlorobenzaldehyde

Gross pathological findings (End of administration : D42)

| Organs      | Sex:         | M  | M  | M   | M      |
|-------------|--------------|----|----|-----|--------|
| Findings    | Dose(mg/kg): | 0  | 40 | 200 | 1000a) |
|             | Number:      | 12 | 12 | 12  | 3      |
| Epididymis  |              |    |    |     |        |
| Focus,white |              | 0  | 0  | 1   | 0      |

M : Male

a): This group was subjected to necropsy on day 15 of administration.

Table 5-2

A reproduction/developmental toxicity screening test in rats  
treated orally with 4-Chlorobenzaldehyde

Gross pathological findings (End of administration : L4)

| Organs              | Sex:<br>Dose(mg/kg):<br>Number: | F<br>0<br>12 | F<br>40<br>12 | F<br>200<br>12 | F<br>1000a)<br>5 |
|---------------------|---------------------------------|--------------|---------------|----------------|------------------|
| Uterus              |                                 |              |               |                |                  |
| Focus,hard          |                                 | 0            | 0             | 0              | 1                |
| Vagina              |                                 |              |               |                |                  |
| Retention,red mucus |                                 | 0            | 0             | 0              | 1                |
| Heart               |                                 |              |               |                |                  |
| Focus,white         |                                 | 0            | 0             | 1              | 0                |

F : Female

a): This group was subjected to necropsy on day 15 of administration.

Table 5-3

A reproduction/developmental toxicity screening test in rats  
treated orally with 4-Chlorobenzaldehyde  
Gross pathological findings (Found dead)

| Organs                             | Dose(mg/kg): | Sex:<br>Number: | M         |
|------------------------------------|--------------|-----------------|-----------|
| Findings                           |              |                 | 1000<br>9 |
| Spleen                             |              |                 |           |
| Small                              |              |                 | 2         |
| Lung(bronchus)                     |              |                 |           |
| Focus, dark                        |              |                 | 1         |
| Stomach                            |              |                 |           |
| Focus, raised, forestomach         |              |                 | 1         |
| Focus, dark red, glandular stomach |              |                 | 3         |

M : Male

Table 5-4

A reproduction/developmental toxicity screening test in rats  
treated orally with 4-Chlorobenzaldehyde  
Gross pathological findings (Found dead)

| Organs                             | Sex:                    | F         |
|------------------------------------|-------------------------|-----------|
| Findings                           | Dose(mg/kg):<br>Number: | 1000<br>7 |
| Spleen                             |                         |           |
| Small                              |                         | 2         |
| Stomach                            |                         |           |
| Focus, dark red, glandular stomach |                         | 2         |

F : Female

Table 6-1

A reproduction/developmental toxicity screening test in rats  
treated orally with 4-Chlorobenzaldehyde

Histopathological findings (End of administration : D42)

| Organs                            | Sex:<br>Dose(mg/kg):<br>Number: | M<br>0<br>12 | M<br>40<br>12 | M<br>200<br>12 | M<br>1000a)<br>3 |
|-----------------------------------|---------------------------------|--------------|---------------|----------------|------------------|
| Epididymis                        |                                 |              |               |                |                  |
| Number examined                   |                                 | 12           | 12            | 12             | 3                |
| Not remarkable                    |                                 | 8            | 10            | 9              | 0                |
| Cell infiltration, interstitial   |                                 | 4            | 1             | 2              | 3                |
| minimal                           |                                 | 4            | 1             | 2              | 3                |
| Granuloma, spermatic              |                                 | 0            | 1             | 1              | 0                |
| mild                              |                                 | 0            | 1             | 1              | 0                |
| Prostate                          |                                 |              |               |                |                  |
| Number examined                   |                                 | 12           | 12            | 12             | 3                |
| Not remarkable                    |                                 | 2            | 5             | 3              | 1                |
| Cell infiltration, inflammatory   |                                 | 10           | 7             | 9              | 2                |
| minimal                           |                                 | 9            | 6             | 7              | 2                |
| mild                              |                                 | 1            | 1             | 2              | 0                |
| Seminal vesicle                   |                                 |              |               |                |                  |
| Number examined                   |                                 | 12           | 12            | 12             | 3                |
| Not remarkable                    |                                 | 11           | 12            | 12             | 3                |
| Necrosis, single cell, epithelial |                                 | 1            | 0             | 0              | 0                |
| minimal                           |                                 | 1            | 0             | 0              | 0                |
| Testis                            |                                 |              |               |                |                  |
| Number examined                   |                                 | 12           | 0             | 12             | 3                |
| Not remarkable                    |                                 | 12           | 0             | 12             | 3                |

M : Male

a): This group was subjected to necropsy on day 15 of administration.

Table 6-2 A reproduction/developmental toxicity screening test in rats  
treated orally with 4-Chlorobenzaldehyde  
Histopathological findings (End of administration : L4)

| Organs                       | Sex:<br>Dose(mg/kg):<br>Number: | F<br>0<br>12 | F<br>40<br>12 | F<br>200<br>12 | F<br>1000a)<br>5 |
|------------------------------|---------------------------------|--------------|---------------|----------------|------------------|
| Findings                     |                                 |              |               |                |                  |
| Ovary                        |                                 |              |               |                |                  |
| Number examined              |                                 | 12           | 1             | 12             | 5                |
| Not remarkable               |                                 | 12           | 1             | 12             | 5                |
| Uterus                       |                                 |              |               |                |                  |
| Number examined              |                                 | 12           | 1             | 12             | 5                |
| Not remarkable               |                                 | 12           | 1             | 12             | 4                |
| DECIDUOMA                    |                                 | 0            | 0             | 0              | 1                |
| present                      |                                 | 0            | 0             | 0              | 1                |
| Vagina                       |                                 |              |               |                |                  |
| Number examined              |                                 | 12           | 12            | 12             | 5                |
| Not remarkable               |                                 | 12           | 12            | 12             | 0                |
| Mucification,epithelial cell |                                 | 0            | 0             | 0              | 5                |
| minimal                      |                                 | 0            | 0             | 0              | 1                |
| mild                         |                                 | 0            | 0             | 0              | 4                |
| Heart                        |                                 |              |               |                |                  |
| Number examined              |                                 | 0            | 0             | 1              | 0                |
| Degeneration,myocardial      |                                 | 0            | 0             | 1              | 0                |
| moderate                     |                                 | 0            | 0             | 1              | 0                |

F : Female

a): This group was subjected to necropsy on day 15 of administration.

Table 6-3 A reproduction/developmental toxicity screening test in rats treated orally with 4-Chlorobenzaldehyde  
 Histopathological findings (Found dead)

| Organs   | Sex:                    | M         |
|--|-------------------------|-----------|
| Findings   | Dose(mg/kg):<br>Number: | 1000<br>9 |
| Epididymis   |                         |           |
| Number examined  |                         | 9         |
| Not remarkable   |                         | 6         |
| Necrosis, single cell, epithelial, caput, duct of epididymis |                         | 3         |
| minimal  |                         | 2         |
| mild   |                         | 1         |
| Prostate   |                         |           |
| Number examined  |                         | 9         |
| Not remarkable   |                         | 2         |
| Cell infiltration, inflammatory                              |                         | 2         |
| minimal  |                         | 2         |
| Necrosis, single cell, epithelial, ventral                   |                         | 6         |
| minimal  |                         | 5         |
| mild   |                         | 1         |
| Seminal vesicle  |                         |           |
| Number examined  |                         | 4         |
| Not remarkable   |                         | 1         |
| Sample autolysed   |                         | 5         |
| Necrosis, single cell, epithelial                            |                         | 3         |
| minimal  |                         | 2         |
| mild   |                         | 1         |
| Testis   |                         |           |
| Number examined  |                         | 9         |
| Not remarkable   |                         | 9         |
| Stomach  |                         |           |
| Number examined  |                         | 4         |
| Degeneration, mucosal, forestomach                           |                         | 1         |
| mild   |                         | 1         |
| Erosion, glandular stomach                                   |                         | 3         |
| minimal  |                         | 1         |
| mild   |                         | 2         |
| Spleen   |                         |           |
| Number examined  |                         | 2         |
| Atrophy  |                         | 2         |
| mild   |                         | 2         |
| Lung(bronchus)   |                         |           |
| Number examined  |                         | 1         |
| Not remarkable   |                         | 1         |

M : Male

Table 6-4

A reproduction/developmental toxicity screening test in rats  
treated orally with 4-Chlorobenzaldehyde

Histopathological findings (Found dead)

| Organs                       | Sex:<br>Dose(mg/kg):<br>Number: | F<br>1000<br>7 |
|------------------------------|---------------------------------|----------------|
| Findings                     |                                 |                |
| Ovary                        |                                 |                |
| Number examined              |                                 | 7              |
| Not remarkable               |                                 | 7              |
| Uterus                       |                                 |                |
| Number examined              |                                 | 7              |
| Not remarkable               |                                 | 7              |
| Vagina                       |                                 |                |
| Number examined              |                                 | 7              |
| Not remarkable               |                                 | 5              |
| Mucification,epithelial cell |                                 | 2              |
| minimal                      |                                 | 2              |
| Stomach                      |                                 |                |
| Number examined              |                                 | 2              |
| Erosion,glandular stomach    |                                 | 2              |
| mild                         |                                 | 2              |
| Spleen                       |                                 |                |
| Number examined              |                                 | 2              |
| Atrophy                      |                                 | 2              |
| mild                         |                                 | 2              |

F : Female

Table 7 A reproduction/developmental toxicity screening test in rats treated orally with 4-Chlorobenzaldehyde  
Estrous cycle in female rats during the pre-mating period

| Dose<br>mg/kg | No. of<br>animals | Count of estrus |   |   |   |   | Mean±S.D.  | Mean duration<br>of cycles<br>Mean±S.D. |
|---------------|-------------------|-----------------|---|---|---|---|------------|---|
|               |                   | 0               | 1 | 2 | 3 | 4 |            |   |
| 0             | 12                | 0               | 0 | 0 | 5 | 7 | 3.6±0.5    | 4.1±0.3                                 |
| 40            | 12                | 0               | 0 | 0 | 6 | 6 | 3.5±0.5    | 4.2±0.5                                 |
| 200           | 12                | 0               | 0 | 0 | 7 | 5 | 3.4±0.5    | 4.1±0.3                                 |
| 1000          | 5                 | 0               | 2 | 2 | 1 | 0 | 1.8±0.8**D | 4.3±0.6                                 |

\*\* : p<0.01 (Significant difference from control group)  
D: Dunnett's test

Table 8

A reproduction/developmental toxicity screening test in rats treated orally with  
4-Chlorobenzaldehyde

Mating and fertility of animals

| Dose<br>mg/kg | Male            |                                       |                               |                                 | Female            |                                       |                               |                              |
|---------------|-----------------|---------------------------------------|-------------------------------|---------------------------------|-------------------|---------------------------------------|-------------------------------|------------------------------|
|               | No. of<br>males | Days until<br>copulation<br>Mean±S.D. | Copulation<br>index<br>(%) a) | Insemination<br>index<br>(%) b) | No. of<br>females | Days until<br>copulation<br>Mean±S.D. | Copulation<br>index<br>(%) a) | Fertility<br>index<br>(%) c) |
| 0             | 12              | 2.9±1.0                               | 12/12(100.0)                  | 12/12(100.0)                    | 12                | 2.9±1.0                               | 12/12(100.0)                  | 12/12(100.0)                 |
| 40            | 12              | 3.1±0.9                               | 12/12(100.0)                  | 12/12(100.0)                    | 12                | 3.1±0.9                               | 12/12(100.0)                  | 12/12(100.0)                 |
| 200           | 12              | 2.5±1.2                               | 12/12(100.0)                  | 12/12(100.0)                    | 12                | 2.5±1.2                               | 12/12(100.0)                  | 12/12(100.0)                 |

a): (No. of copulated animals / No. of mated animals) × 100

b): (No. of males which impregnated females / No. of copulated males) × 100

c): (No. of pregnant females / No. of copulated females) × 100

No significant difference in any treated groups from control group

Table 9 A reproduction/developmental toxicity screening test in rats treated orally with 4-Chlorobenzaldehyde  
Delivery data on dams

| Dose mg/kg |       | No. of pregnant females | No. of females with liveborns | Delivery index % a) | Gestation length in days | No. of corpora lutea | No. of implantation sites | Implantation index % b) | No. of stillborns (%)c) | No. of liveborns | Live birth index % d) |
|------------|-------|-------------------------|-------------------------------|---------------------|--------------------------|----------------------|---------------------------|-------------------------|-------------------------|------------------|-----------------------|
| 0          | Total | 12                      | 12                            | 100.0               |                          | 184                  | 167                       |                         | 1                       | 153              |                       |
|            | Mean  |                         |                               |                     | 22.1                     | 15.3                 | 13.9                      | 89.3                    | ( 0.7)                  | 12.8             | 90.3                  |
|            | S.D.  |                         |                               |                     | 0.3                      | 2.9                  | 3.7                       | 19.0                    | ( 2.4)                  | 3.7              | 12.2                  |
| 40         | Total | 12                      | 12                            | 100.0               |                          | 201                  | 194                       |                         | 7                       | 176              |                       |
|            | Mean  |                         |                               |                     | 22.0                     | 16.8                 | 16.2                      | 96.7                    | ( 3.5)                  | 14.7             | 90.9                  |
|            | S.D.  |                         |                               |                     | 0.4                      | 1.8                  | 1.5                       | 4.3                     | ( 9.7)                  | 1.9              | 9.8                   |
| 200        | Total | 12                      | 12                            | 100.0               |                          | 188                  | 180                       |                         | 2                       | 165              |                       |
|            | Mean  |                         |                               |                     | 22.1                     | 15.7                 | 15.0                      | 95.4                    | ( 1.2)                  | 13.8             | 91.4                  |
|            | S.D.  |                         |                               |                     | 0.3                      | 2.4                  | 2.7                       | 5.3                     | ( 2.8)                  | 2.8              | 8.5                   |

a): (No. of females which delivered liveborns / No. of pregnant females) × 100

b): (No. of implantation sites / No. of corpora lutea) × 100

c): (No. of stillborns / No. of liveborns and stillborns) × 100

d): (No. of liveborns / No. of implantation sites) × 100

No significant difference in any treated groups from control group

Table 10 A reproduction/developmental toxicity screening test in rats treated orally with 4-Chlorobenzaldehyde  
Sex ratio and external examination of pups

| Dose<br>mg/kg | No. of<br>dams |       | Liveborns       |                   | Sex ratio of<br>liveborns<br>at birth<br>a) | Day 4           |                   | Sex ratio of<br>live pups<br>on day 4<br>b) | External c)<br>abnor-<br>malities<br>(%)d) |
|---------------|----------------|-------|-----------------|-------------------|---|-----------------|-------------------|---|--|
|               |                |       | No. of<br>males | No. of<br>females |   | No. of<br>males | No. of<br>females |   |  |
| 0             | 12             | Total | 75              | 78                |   | 74              | 78                |   | 0  |
|               |                | Mean  | 6.3             | 6.5               | 0.45  | 6.2             | 6.5               | 0.45  | ( 0.0)                                     |
|               |                | S.D.  | 2.6             | 2.0               | 0.17  | 2.5             | 2.0               | 0.17  | ( 0.0)                                     |
| 40            | 12             | Total | 88              | 88                |   | 81              | 82                |   | 0  |
|               |                | Mean  | 7.3             | 7.3               | 0.50  | 7.4             | 7.5               | 0.49  | ( 0.0)                                     |
|               |                | S.D.  | 2.1             | 1.6               | 0.10  | 2.2             | 1.4               | 0.10  | ( 0.0)                                     |
| 200           | 12             | Total | 78              | 87                |   | 68              | 77                |   | 0  |
|               |                | Mean  | 6.5             | 7.3               | 0.45  | 6.2             | 7.0               | 0.45  | ( 0.0)                                     |
|               |                | S.D.  | 2.8             | 1.6               | 0.16  | 2.8             | 1.7               | 0.17  | ( 0.0)                                     |

a): No. of liveborn males / No. of liveborns

b): No. of live males on day 4 / No. of live pups on day 4

c): No. of liveborns with external abnormalities

d): (No. of liveborns with external abnormalities / No. of liveborns) × 100

No significant difference in any treated groups from control group

Table 11                      A reproduction/developmental toxicity screening test in rats treated orally with  
4-Chlorobenzaldehyde

Viability index of pups

| Dose<br>mg/kg |       | No.<br>of<br>dams | No. of live pups |       | Viability<br>index on<br>postnatal<br>day 4 % a) |
|---------------|-------|-------------------|------------------|-------|--|
|               |       |                   | Day 0            | Day 4 |  |
| 0             | Total | 12                | 153              | 152   |  |
|               | Mean  |                   | 12.8             | 12.7  | 99.4   |
|               | S.D.  |                   | 3.7              | 3.7   | 1.9  |
| 40            | Total | 12                | 176              | 163   |  |
|               | Mean  |                   | 14.7             | 13.6  | 91.1   |
|               | S.D.  |                   | 1.9              | 4.6   | 28.8   |
| 200           | Total | 12                | 165              | 145   |  |
|               | Mean  |                   | 13.8             | 12.1  | 88.7   |
|               | S.D.  |                   | 2.8              | 4.5   | 28.5   |

a): (No. of live pups on day 4 / No. of liveborns on day 0) × 100  
No significant difference in any treated groups from control group

Table 12 A reproduction/developmental toxicity screening test in rats treated orally with 4-Chlorobenzaldehyde  
Body weight of pups

| Dose<br>mg/kg |      | Male             |                  |      | Female |                  |      |
|---------------|------|------------------|------------------|------|--------|------------------|------|
|               |      | 0                | 4a)              | Gain | 0      | 4a)              | Gain |
| 0             | No.  | 11 <sup>b)</sup> | 11               | 11   | 12     | 12               | 12   |
|               | Mean | 6.7              | 10.0             | 3.3  | 6.4    | 9.5              | 3.1  |
|               | S.D. | 0.3              | 1.1              | 1.2  | 0.5    | 1.1              | 1.2  |
| 40            | No.  | 12               | 11 <sup>c)</sup> | 11   | 12     | 11 <sup>c)</sup> | 11   |
|               | Mean | 6.4              | 9.6              | 3.1  | 6.0    | 9.1              | 3.1  |
|               | S.D. | 0.4              | 1.3              | 1.2  | 0.4    | 1.3              | 1.2  |
| 200           | No.  | 12               | 11 <sup>c)</sup> | 11   | 12     | 11 <sup>c)</sup> | 11   |
|               | Mean | 6.4              | 10.3             | 3.9  | 6.1    | 9.6              | 3.5  |
|               | S.D. | 1.0              | 2.4              | 1.5  | 0.7    | 1.8              | 1.2  |

Unit: g

No.: No. of dams

a): Postnatal day

b): Male pups were not born in one dam.

c): All pups in one dam died.

No significant difference in any treated groups from control group

Table 13                    A reproduction/developmental toxicity screening test in rats treated orally with  
4-Chlorobenzaldehyde  
Gross pathological findings in pups on postnatal day 4

|                                    | Dose (mg/kg) | 0  | 40 | 200 |
|------------------------------------|--------------|----|----|-----|
| Male                               |              |    |    |     |
| No. of pups examined               |              | 74 | 81 | 68  |
| No. of pups with abnormal findings |              | 0  | 0  | 0   |
| Female                             |              |    |    |     |
| No. of pups examined               |              | 78 | 82 | 77  |
| No. of pups with abnormal findings |              | 0  | 0  | 0   |